Ministerium für Land-, Forst- und Nahrungsgüterwirtschaft
der
Deutschen Demokratischen Republik
Abteilung Veterinärwesen

Klinisch-chemische UNTERSUCHUNGSMETHODEN für veterinär-medizinische Einrichtungen der Deutschen Demokratischen Republik

Band 2

Institut für angewandte Tierhygiene Eberswalde-Finow

KALZIUM	M 01.2
NATRIUM	M 03.1
KALIUM	M 04.1

Flammenphotometrische Bestimmung (FLAPHO 4 und MODELL III)

In einer Azetylen/Luft-Flamme werden Alkalimetall- u. Erdalkalimetallatome zur Emission eines diskontinuierlichen Spektrums angeregt. Die Intensität des emittierten Lichtes ist der Konzentration der entsprechenden Metallionen in den Probelösungen proportional.

Plasma, Serum

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Natriumchlorid p.a.	Bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz trocknen. (gilt für 1–3)
2	Kaliumchlorid p.a.	
3	Kalziumkarbonat p.a.	
4	Na-Lg.	210,40 g Natriumchlorid in bidest. Wasser lösen und zu 1 000 ml auffüllen.
5	K-Lg.	16,03 g Kaliumchlorid in bidest. Wasser lösen und zu 1 000 ml auffüllen.
6	Ca-Lg.	12,51 g Kalziumkarbonat in wenig Salzsäure lösen und mit bidest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.
7	Wasser/Methanol-Gemisch	200 ml Methanol p.a. werden zu 1 000 ml Lösung mit bidest. Wasser ergänzt.

Fortsetzung Blatt 2

Reagenzien (Fortsetzung von Blatt 1):

Nr.	Reagenz	Herstellung

8 Na-Standard-Lösungen:

Lg.:	a	b	c	d	e
mÄqu. Na/l mg Na/100 ml	115 264	130 299	144 331	160 368	175 402
Herstellung:					
Einwaage g NaCL	6.721	7.598	8.416	9.351	10.228
+ ml K-Lg.			20		
+ ml Ca-Lg.			20		

alle 5 Lösungen mit bidest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.

9 K-Standard-Lösungen:

	a	b	c	d	e
mÄqu. K/l mg K/100 ml	3,5 13,7	4,0 15,6	4,3 16,8	5,0 19,6	5,5 21,5
Herstellung:					
Einwaage g KCl	0,261	0,298	0,321	0,373	0,410
+ ml Na-Lg.			40		
+ ml Ca-Lg.			20		

alle 5 Lösungen mit bidest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.

Fortsetzung Blatt 3

KALZIUM NATRIUM KALIUM	Flammenphotometrische Bestimmung (FLAPHO 4; MODELL III)	Plasma Serum	M 01.2 M 03.1 M 04.1

Reagenzien (Fortsetzung von Blatt 2):

Nr.	Reagenz	Herstellung
10	Ca-Standard-Lösungen:	

<table>
<tr><td>Lg.:</td><td>a</td><td>b</td><td>c</td><td>d</td><td>e</td></tr>
<tr><td>mÄqu. Ca/l
mg Ca/100 ml</td><td>4,0
8,0</td><td>4,5
9,0</td><td>5,0
10,0</td><td>5,5
11,0</td><td>6,0
12,0</td></tr>
<tr><td colspan="6">Herstellung:</td></tr>
<tr><td>Einwaage g $CaCO_3$</td><td>0,200</td><td>0,225</td><td>0,250</td><td>0,275</td><td>0,300</td></tr>
<tr><td>+ ml konz. HCl</td><td colspan="5">1,0</td></tr>
<tr><td>+ ml Na-Lg.</td><td colspan="5">40</td></tr>
<tr><td>+ ml K-Lg.</td><td colspan="5">20</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="5">alle 5 Lösungen mit bidest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.</td></tr>
</table>

Ausführung (FLAPHO 4):

A. Vorbereitung der Proben:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	PH	0,2 ml Plasma (Serum)	0,2 ml Na-, K-, Ca- Stand.-Lgen. a - e	
2		+ 3,8 ml bidest. Wasser mischen (= Verdünnung 1).		
		Verdünnung 1 → zur Bestimmung von KALZIUM → zur Bestimmung von KALIUM		
3	PH	0,2 ml Verdünnung 1 der Probe	0,2 ml Verdünnung 1 der Na-St.-Lgen. a - e	
4		+ 1,8 ml bidest. Wasser mischen (= Verdünnung 2).		
		Verdünnung 2 → zur Bestimmung von NATRIUM		

Ausführung (FLAPHO 4) - Fortsetzung:

B. Bestimmung von KALZIUM, NATRIUM und KALIUM:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1		Einstellung des FLAPHO 4 (s. dazu auch Betriebsanleitung): a. Preßluftmenge auf ca. 280 l/Std. einstellen. b. Azetylenmenge nach Ermittlung des Umkehrpunktes einstellen (ca. 60 l/Std.). c. — Kanal / Filter / Verstärkerstufe Ca: 1 / Ca 62 / ca. 7 Na: 1 / Na 59 / ca. 3 K: 2 / K 77 / ca. 4	
2		Messung: a. Nulleinstellung mit bidest. Wasser. b. Messung der Standardansätze a - e des jeweiligen Elementes nach steigender Konzentration. Meßwert-Ermittlung auf der Ca- bzw. Na- bzw. K-Skala. c. Messung der Probelösungen. Nach jeweils 5 Proben sind die Nulleinstellung und der Meßwert des Standardansatzes c zu überprüfen (evtl. nachstellen). Meßwert-Ermittlung auf der Ca- bzw. Na- bzw. K-Skala.	

Berechnung (Ausführung FLAPHO 4):

Die Probenkonzentrationen können auf der Ca- bzw. Na- bzw. K-Skala direkt abgelesen werden, wenn die Konzentrationen der Standardansätze (in mÄqu/l) richtig angezeigt werden.
Treten Abweichungen auf, dann ist aus den Standardkonzentrationen und den jeweiligen Meßwerten eine Eichkurve zu konstruieren. Die Probenkonzentrationen sind dann daran zu ermitteln.

1 mÄqu. Ca/l = 2,00 mg Ca/100 ml
1 mÄqu. Na/l = 2,30 mg Na/100 ml
1 mÄqu. K/l = 3,91 mg K/100 ml

Anmerkungen:

Ausführung (MODELL III):

A. Vorbereitung der Proben:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	PH	0,3 ml Plasma (Serum)	0,3 ml Na-, K-, Ca-Stand.-Lgen. a-e	
2		+ 2,7 ml Wasser/Methanol-Gemisch mischen (= Verdünnung 1).		
		Verdünnung 1 → zur Bestimmung von KALZIUM → zur Bestimmung von KALIUM ↓		
3	PH	0,2 ml Verdünnung 1 der Probe	0,2 ml Verdünnung 1 der Na-St.-Lgen. a - e	
4		+ 1,8 ml bidest. Wasser mischen (= Verdünnung 2).		
		Verdünnung 2 → zur Bestimmung von NATRIUM		

Ausführung (MODELL III) - Fortsetzung:

B. Bestimmung von KALZIUM, NATRIUM u. KALIUM:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1		Einstellung des MODELL III (s. dazu auch Betriebsanleitung): a. Preßluftdruck auf 0,4 atü einstellen. b. Acetylendruck nach Ermittlung des Umkehrpunktes einstellen. c. Filter: Ca – Ca 63; Na – Na 59; K – K 77 d. Blendenöffnung: 1/2 - 3/4	
2		Messung: a. Leerwerteinstellung mit bidest. Wasser auf 100 Skalenteile. b. Messung der Standardansätze a - e des jeweiligen Elementes nach steigender Konzentration. c. Messung der Probelösungen. Nach jeweils 10 Proben sind die Nulleinstellung und der Meßwert des Standardansatzes c zu überprüfen (evtl. mit Blende nachstellen).	

Berechnung (Ausführung MODELL III):

a. Die ermittelten Meßwerte (Skalenteile) der Standardlösungen a - e der jeweiligen Elemente sind gegen deren Konzentrationen aufzutragen.

b. Die Konzentrationen der Probelösungen sind aus der jeweiligen Eichkurve abzulesen.

1 mÄqu. Ca/l = 2,00 mg Ca/100 ml
1 mÄqu. Na/l = 2,30 mg Na/100 ml
1 mÄqu. K/l = 3,91 mg K/100 ml

Anmerkungen:

KALZIUM NATRIUM KALIUM	Flammenphotometrische Bestimmung (FLAPHO 4 u. MODELL III)	Plasma Serum	M 01.2 M 03.1 M 04.1

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1978

Wiederauffindung (%):

	Ca	Na	K
FLAPHO 4 MODELL III		98 - 100	

Präzision:

in der Serie: s %:
(n = 20)

	Ca	Na	K
FLAPHO 4 MODELL III	$\leq$2,0	$\leq$2,0	$\leq$2,0

von Tag zu Tag: s %:
(n = 20)

	Ca	Na	K
FLAPHO 4 MODELL III	$\leq$3,0	$\leq$3,0	$\leq$3,0

Probenanzahl/Tag · AK:

mind. 300
(Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

MAGNESIUM	M 02.2.S

Magon-Siebtest:

Magnesium-Ionen bilden in wäßrig-alkoholischer Lösung bei pH 9 - 10 mit Magon eine rotviolette Komplexverbindung.

Serum, Plasma (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Triäthanolamin		s. u. 3 !
2	Magon (x)		
3	Testlösung		Zu 10 ml Triäthanolamin werden 10 mg Magon gegeben; Lg. mit bidest. Wasser zu 100 ml auffüllen. Haltbarkeit: mind. 2 Wochen. Achtung! Die Testlösung muß blau sein. Bei Rotfärbung ist das Triäthanolamin durch Destillation unter vermindertem Druck zu reinigen (Kp: 208 °C bei 10 Torr).
4	Mg-Standard-Lg.	0,75 mM	a. Testalampulle "M/10 $MgCl_2$" auf 1 000 ml Lg. auffüllen. Oder: 0,403 g Magnesiumoxid p.a. in wenig halbkonz. Salzsäure lösen; mit dest. Wasser zu 100 ml Lg. auffüllen. b. 0,75 ml Lg a mit dest. Wasser zu 100 ml Lg. auffüllen

(x) Magon = Natriumsalz der 1-Azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylkarboxyanilido)-naphthalin-1-(2-hydroxybenzol)-4-sulfonsäure ($C_{25}H_{20}N_3O_6SNa$)

MAGNESIUM	Magon-Siebtest	Serum, Plasma	M 02.2.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	Tüpfelplatte	10 µl Serum (Plasma)	10 µl Mg-Standard-Lg. b	2
2		+ 150 µl Testlösung		
		mischen.		
3		Farbvergleich zwischen Proben- und Standardansatz.		

Auswertung:

Mit steigender Magnesiumionenkonzentration färbt sich das Reaktionsgemisch zunehmend rot (Linearität im Bereich von 0 - 1 mMol/l).

Ist der Farbton der Probeansätze rötlicher als der des Standardansatzes, so ist deren Magnesiumionenkonzentration $>$0,75 mM/l = 1,82 mg/100 ml Serum (Plasma).

Anmerkungen:

1	Als Antikoagulanz für die Plasmagewinnung nur Heparin verwenden!
2	Durch Veränderung der Konzentration der Mg-Standard-Lg. können beliebige andere Grenzwerte eingestellt werden.

MAGNESIUM	Magon-Siebtest	Serum, Plasma	M 02.2.S

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1977
Proben mit einer Mg^{2+}-Konzentrationsdifferenz von 0,1 mMol/l (=0,24 mg/100 ml) sind gut voneinander zu unterscheiden.	
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 7oo (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

EISENBINDUNGSKAPAZITÄT (totale)	M 05.1.1

<u>Bathophenanthrolin-Methode (ohne Enteiweißung)</u>:
Durch Zugabe einer überschüssigen Menge Fe^{2+}-Ionen zum Serum (Plasma) wird das Transferrin Fe-gesättigt. Danach wird das überschüssige Fe^{2+} zusammen mit basischem Magnesiumkarbonat ausgefällt. Im Überstand ist das proteingebundene Fe entsprechend Methode M 05.1 quantitativ zu bestimmen.

Serum, Plasma (Anmerkung 1)

<u>Reagenzien</u>:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Magnesiumchlorid-Lg.	ca. 2 %	20 g Magnesiumchlorid p.a. in 1 000 ml dest. Wasser lösen.
2	Hydroxylammoniumchlorid p.a.		
3	Natronlauge	30 %	30 g Natriumhydroxid p.a. in 70 ml dest. Wasser lösen.
4	Eisessig p.a.		
5	Emulgator-Lg.		180 g EMULGATOR E 30 in 400 ml heißem dest. Wasser lösen, 300 ml Magnesiumchlorid-Lg. und danach soviel Natronlauge (max. 2 - 3 ml) zugeben, daß das Mg als $Mg(OH)_2$ ausfällt. Am nächsten Tag filtrieren. 20 g Hydroxylammoniumchlorid in wenig dest. Wasser zugeben. Lg. mit Eisessig auf pH 5 einstellen, kühl aufbewahren. Lg. vor Gebrauch mit gleichen Volumenteilen bidest. Wasser verdünnen.
6	Bathophenanthrolin-Lg.		25 mg Bathophenanthrolin-disulfonsaures-Na in 10 ml dest. Wasser lösen.
7	Natriumkarbonat-Lg.	0,6 M	17,8 g Natriumkarbonat ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$) in dest. Wasser lösen und zu 100 ml auffüllen.
8	Magnesiumsulfat-Lg.	0,6 M	14,8 g Magnesiumsulfat p.a. ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) in dest. Wasser lösen und zu 100 ml auffüllen.

Reagenzien (Fortsetzung):

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
9	Eisen-Lg.	2 mg/ 100 ml	140,8 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat p.a. ($(NH_4)_2$ Fe $(SO_4)_2$ · 6 H_2O) in dest. Wasser lösen und zu 1 000 ml auffüllen. 2 Tropfen konz. Schwefelsäure zugeben.
10	Eisen-Standard-Lg.	1 mg/ 100 ml	70,4 mg Ammoniumeisen(II)-sulfat p.a. ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ · 6 H_2O) in dest. Wasser lösen und zu 1 000 ml auffüllen. 2 Tropfen konz. Schwefelsäure zugeben. Für die Eichkurve 0,5, 1,0 ... 3,0 ml Lg. mit dest. Wasser zu 10 ml auffüllen (≙ 175, 350 ... 1 050 µg Fe/100 ml) Haltbarkeit der verdünnten Eichlösungen: mind. 3 Tage

Ausführung:

A. Sättigung des Transferrins mit Eisen-Ionen:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	L_P	
1	PA	0,2 ml Serum (Plasma) + 0,1 ml Eisen-Lg.	0,2 ml Serum (Plasma) + 0,1 ml dest. Wasser	
		mischen, 10 Min. im Wasserbad (37 °C) erwärmen.		
2		+ 0,2 ml Natriumkarbonat-Lg. + 0,2 ml Magnesiumsulfat-Lg.		
		mischen, nach 35 Min. zentrifugieren, Überstand weiter nach B verarbeiten.		

Ausführung (Fortsetzung):

B. Bestimmung des Transferrin-Eisens:

	Geräte	Ausführung				Anmerkungen
1	H-RG	0,9 ml Emulgator-Lg.				2, 3
2		P	L_P	St	L_{St}	
		+ 0,3 ml Überstand aus A	+ 0,3 ml Überstand aus A	+ 0,3 ml Fe-Stand.-Eichlg.	+ 0,3 ml dest. Wasser	4, 5
		+ 0,03 ml Bathoph.-Lg.	+ 0,03 ml dest. Wasser	+ 0,03 ml Bathoph.-Lg.	+ 0,03 ml dest. Wasser	6
			mischen.			
3			Nach mind. 30 Min. P gegen L_P und St gegen L_{St} bei 535 nm photometrieren.			

Berechnung:

a. Die Extinktionen der Fe-Standard-Ansätze (Eichpunkte) sind gegen deren Fe-Konzentrationen aufzutragen (Anmerkung 2).

b. Die totale Eisenbindungskapazität der Proben ist auf der Eichgeraden abzulesen.
Angaben in µg Fe/100 ml Serum (Plasma).

Anmerkungen:

1	Als Antikoagulanz für Plasmagewinnung Heparin verwenden!
2	Die Emulgator-Lg. darf sich bei Zusatz von Bathophenanthrolin-Lg. höchstens noch schwach rosa färben. In solchen Fällen verläuft die Eichkurve nicht durch den Koordinatenursprung.
3	Vor dem Zusammengeben sind die Emulgator-Lg. und das Serum (Plasma) auf Zimmertemperatur zu erwärmen.
4	Sollten nach dem Zusatz von Serum (Plasma) zur Emulgator-Lg. Trübungen auftreten, dann ist der pH-Wert der Emulgator-Lg. zu überprüfen; nötigenfalls ist er mit Natronlauge bis auf 5,5 zu erhöhen.
5	Für jede Probe ist ein gesonderter L_P zu bereiten.
6	Die zugesetzte Menge Bathophenanthrolin-Lg. ist ausreichend für Fe-Konzentrationen bis 1 750 µg Fe/100 ml (totale Fe-Bindungskapazität)

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1974

Wiederauffindung:

Präzision:

a. in der Serie: (n = 20) — s % ⩽ 4,0

b. von Tag zu Tag: (n = 20) — s % ⩽ 6,0

Probenanzahl/Tag . AK: 40 (Doppelbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

ANORGANISCHES PHOSPHAT	M 06.2.S

Siebtest:

Phosphat-Ionen werden mit Molybdat zu Molybdatophosphorsäure umgesetzt, die mit Malachitgrün eine blaugrüne Additionsverbindung ergibt.

Plasma, Serum

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Polyvinylalkohol-Lg.	0,5 g/ 100 ml	0,5 g Polyvinylalkohol in 90 ml dest. Wasser durch Erwärmen lösen. Nach dem Abkühlen zu 100 ml auffüllen.
2	Malachitgrün-Lg.	5 mM	182 mg Malachitgrün in 100 ml Polyvinylalkohol-Lg. lösen.
3	Ammoniummolybdat-Lg.	10 mM	1,235 g Ammoniummolybdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$) in 50 ml dest. Wasser lösen; 50 ml konz. Salzsäure p.a. zugeben. Haltbarkeit: mind. 4 Wochen
4	Testlösung		10 ml Malachitgrün-Lg. mit 8 ml Ammoniummolybdat-Lg. mischen; mit dest. Wasser zu 100 ml auffüllen. Vor Gebrauch 30 Min. stehenlassen. Haltbarkeit: mind. 2 Wochen (Plasteflasche!)

ANORGANISCHES PHOSPHAT	Siebtest	Plasma, Serum	M 06.2.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	Mischplatte	200 µl dest. Wasser		1
2		P	St	2
		+ 10 µl Plasma (Serum)	+ 10 µl Testplasma (-serum)	
		mischen.		
3	Tüpfelplatte	20 µl Verdünnung + 130 µl Testlösung		3
		mischen.		
4		Nach 30 Min. visuelle Einschätzung der Farbintensität der Probeansätze.		

Auswertung:

Die Farbintensität der Ansätze ist proportional der Phosphatkonzentration im Plasma bzw. Serum.

Die Farbintensität der Probeansätze wird gegen die des Standardansatzes visuell eingeschätzt.

ANORGANISCHES PHOSPHAT	Siebtest	Plasma, Serum	M 06.2.S

Anmerkungen:

1	Die bereitete Serumverdünnung kann auch für den Glukose-Siebtest (K 01.2 S), den Gesamt-Eiweiß-Siebtest (E 01.2 S) und den γ-Globulin-Siebtest (E 03.1 S) eingesetzt werden.
2	Als Testplasma (-serum) sind Proben mit einer Phosphatkonzentration an der unteren Grenze des Normbereiches zu verwenden. Standardlösungen oder mit Wasser verdünnte Plasmaproben sind nicht einzusetzen!
3	Die Zugabe der Testlösung zu allen angesetzten Verdünnungen muß schnell und ohne zeitliche Verzögerungen erfolgen.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1977
Proben mit Phosphatkonzentrationsdifferenzen von 1 mg/100 ml sind gut voneinander zu unterscheiden.	
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 500 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979



NETTO-SÄURE/BASE-AUSSCHEIDUNG (NSBA)	M 10.1

Säure-Base-Titration:
Definiert angesäuerter Harn wird nach Zugabe von Formalin mit Natronlauge gegen Phenolrot titriert.

Harn (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Salzsäure	1 N	Testampulle (HCl; 1 N) mit dest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.
2	Natronlauge	0,1 N	Testampulle (NaOH; 0,1 N) mit dest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.
3	Formaldehyd-Lg.	ca. 20 %	1 000 ml ca. 30 %ige Formaldehyd-Lg. mit 500 ml dest. Wasser verdünnen; pH-Wert auf 6 - 8 (Indikatorpapier!) einstellen.
4	Indikator-Lg.	0,1 %	0,1 g Phenolrot in ca. 20 ml Äthanol lösen (evtl. erwärmen); mit dest. Wasser zu 100 ml auffüllen.
5	NSBA-Standard-Harn		Mischharn von 5 - 10 Kühen (s. Anmerkung 1) gewinnen und in 15 ml-Portionen bei <-12 °C aufbewahren.

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	Becherglas	10,0 ml Harn + x ml Salzsäure	10,0 ml NSBA-Stand.-Harn + y ml Salzsäure	2, 3
		mischen; 30 Sek. kochen; abkühlen lassen.		
2		+ 10,0 ml Formaldehyd-Lg. + 0,2 ml Indikator-Lg.		
		mischen.		
3		Mit Natronlauge bis zum Umschlag nach rot/orange titrieren.		4

Berechnung:

$$(V_{Salzsäure} - V_{Natronlauge}) \cdot 10 = x \text{ mÄqu. NSBA/1000 ml Harn}$$

NETTO-SÄURE/BASE-AUSSCHEIDUNG (NSBA)	Säure-Base-Titration	Harn	M 10.1

Anmerkungen:

1	Nur Spontan- oder Katheterharn verwenden. Harnentnahme bis 3 Stunden nach der Fütterung! Alter der Tiere u. Reproduktionsstadium beachten (3. - 6. Laktation; 14. - 200. Melktag) Max. Lagerzeit der Proben bis zur NSBA-Bestimmung: Raumtemp.: 6 Stunden; 2 - 5 °C: 3 Wochen; ≤ -12 °C: 1 Jahr.
2	Harn vor dem Einsatz mischen und auf Raumtemp. erwärmen.
3	Jeder Probe sind gesondert soviel ml (x, y, ...) Salzsäure zuzugeben, daß ein pH-Wert ≤ 4,0 erreicht wird (mit Indikatorpapier prüfen!).
4	Bei stark gefärbten Probelösungen ist eine potentiometrische Titration anzuraten.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	Sektion Tierprod./Veterinärmedizin; Fachgruppe Innere Medizin der KMU Leipzig; 1977
Wiederauffindung:	98 - 100 %
Präzision:	
in der Serie: (n = 20)	s % ≤ 1,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % ≤ 1,0
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 100 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

NETTO-SÄURE/BASE-AUSSCHEIDUNG (NSBA)	M 10.1.S

Siebtest:

Harn wird mit einer definierten Menge Salzsäure angesäuert und aufgekocht. Nach Zugabe von Formalin-Lösung und unterschiedlichen Mengen Natronlauge erlaubt die Färbung des Indikators Phenolrot eine Einschätzung der NSBA.

Harn

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Salzsäure	1 N	Testalampulle "1 N HCl" mit dest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.
2	Natronlauge	1 N	Testalampulle "1 N NaOH" mit dest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen. Anmerkung 1.
3	Phenolrot-Lg.		0,1 g Phenolrot in 20 ml Äthanol (40 °C) lösen und mit dest Wasser zu 100 ml Lg. auffüllen
4	Formalin-Lg.	ca. 20 %	20 ml Formalin DAB 7 (30 %ig) mit 10 ml dest. Wasser verdünnen.
5	Formalin-Phenolrot-Lg.		10 ml Formalin-Lg. mit 0,2 ml Phenolrot-Lg. mischen und mit Natronlauge neutralisieren (auf Mischfarbe rotorange einstellen!).

NETTO-SÄURE/BASE-AUSSCHEIDUNG (NSBA)	Siebtest	Harn	M 10.1.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	H-RG	500 µl Harn + 100 µl Salzsäure mischen. Im Heizblock (120 °C) ca. 1 Min. erhitzen; auf Zimmertemp. abkühlen.	2, 1 3
2		+ 500 µl Formalin-Phenolrot-Lg. mischen.	
3		+ 50 µl Natronlauge mischen. Farbeinschätzung A (bleibt die Mischung zitronengelb, dann Schritt 4 anschließen!)	4
4		+ 50 µl Natronlauge mischen. Farbeinschätzung B	4

Auswertung:

Farbeinschätzung	Färbung	NSBA (mVal/l)	Aussage nach KUTAS
A	rot gelb	$>$ + 100 -	normal -
B	rot gelb	0 - 100 $<$ 0	azidot. Belastung metabol. Azidose

NETTO-SÄURE/BASE-AUSSCHEIDUNG (NSBA)	Siebtest	Harn	M 10.1.S

Anmerkungen:

1	Gleiche Volumina 1 N Salzsäure und 1 N Natronlauge mischen und mit 1 - 2 Tropfen Phenolrot-Lg. versetzen. Die Mischung muß sich rotorange (Mischfarbe des Indikators!) anfärben.
2	Harn nicht filtrieren. Vor Einsatz mischen.
3	Der Harn soll nach dem Zusatz von Salzsäure einen pH-Wert $\leq$ 4 besitzen.
4	Durch portionsweise Zugaben von 10 µl Natronlauge kann im Bedarfsfall die NSBA auf 20 mVal/l genau bestimmt werden.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1976
Harnproben mit einer NSBA-Differenz von 10 - 20 mVal/l sind am Äquivalenzpunkt gut voneinander zu unterscheiden.	
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 400 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

ALKALIRESERVE (AR)	M 11.1.S

Siebtest:

Die AR ist die Gesamtmenge des durch Säure freisetzbaren CO_2 im Vollblut bzw. Blutplasma (in Vol.%). Beim Siebtest diffundiert das freigesetzte CO_2 in eine definierte Menge Natronlauge bekannter Konzentration. Beim Überschreiten des unteren Grenzwertes wird gleichzeitig der Äquivalenzpunkt der Säure-Base-Reaktion durchlaufen; der zugesetzte Indikator Phenolphthalein schlägt von rot nach farblos um.

Vollblut, Plasma (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
	Zum Ansetzen der Reagenzien ist destilliertes Wasser (vor Gebrauch nochmals auskochen!) zu verwenden. Die Vorratsflaschen müssen luftdicht verschließbar sein.		
1	Natriumbikarbonat-Standard-Lg.	0,02 N	0,168 g Natriumbikarbonat ($NaHCO_3$) in Wasser lösen; zu 100 ml auffüllen.
2	Schwefelsäure	ca. 10 %ig	Zu 89 ml Wasser vorsichtig 6 ml konz. Schwefelsäure geben.
3	Natronlauge	0,05 N	Testalampulle "0,1 N Natronlauge" mit Wasser zu 2 000 ml Lg. auffüllen.
4	Testlösung		In 10 ml Natronlauge 10 mg Phenolphthalein lösen. Haltbarkeit: ca. 2 Tage bei 2 - 5 °C im Glasgefäß.

ALKALIRESERVE (AR)	Siebtest	Vollblut, Plasma	M 11.1.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	PA-Deckel m. Filterpapier	20 µl Testlösung		2, 3
2	M-RG m. Filterpapier	50 µl Schwefelsäure		
3		P	St	
		+ 50 µl Vollblut (Plasma)	+ 50 µl $NaHCO_3$-Stand. Lg.	2, 3, 4
		sofort (!) den PA-Deckel mit der Testlösung umgekehrt auf das M-RG fest aufsetzen.		5
4		Nach 1 Stunde visuelle Einschätzung der Farbintensitäten.		

Auswertung:

Färbung	AR	S-B-Haushalt
rot (bzw. farbintensiver als der Standardansatz)	$<$ 44,8 Vol.%	gestört (Azidose)
farblos (bzw. farbschwächer als der Standardansatz)	$>$ 44,8 Vol.%	normal
Umrechnung: mVal HCO_3^-/l = Vol.% CO_2 x 0,449		



ALKALIRESERVE (AR)	Siebtest	Vollblut, Plasma	M 11.1.S

Anmerkungen:

1	Das Blut ist aus einer ungestauten Vene zu entnehmen. Beim Anritzen einer Ohrvene kann das Blut direkt mit einer Mikroliterpipette abgenommen werden. Ansonsten wird eine PA, die 30 µl Heparin und 1 kleine Schrotkugel enthält, bis zum oberen Rand mit Blut gefüllt, sofort verschlossen und geschwenkt. Die Messung muß innerhalb von 2 Stunden (Lagerung über Eis!) erfolgen. Bei Verwendung von Plasma ist entsprechend zu verfahren. Das Plasma muß sofort nach der Blutentnahme gewonnen werden! Die AR des Vollblutes ist ca. 4 Vol.% niedriger als die des Plasmas.
2	Als Filterpapier Chromatographiepapier FN 2 verwenden. In den PA-Deckel ein mit einem Bürolocher ausgestanztes Papierstück einlegen und mit Testlösung tränken. In das M-RG wird ein Papierstück 20 x 25 hochkant als Röllchen eingebracht. Die Schwefelsäure und das Vollblut (Plasma) bzw. die Standard-Lg. werden auf das Papier pipettiert.
3	Es ist darauf zu achten, daß die aufgesetzten PA-Deckel dicht schließen und keinerlei Beschädigungen (Risse, Löcher) aufweisen. Passende M-RG vor Gebrauch heraussuchen!
4	Durch Aufgeben anderer Volumina an $NaHCO_3$-Standard-Lg. kann die Konzentration der Testlösung überprüft werden. Es müssen sich folgende Färbungen ergeben: 45 µl Stand.-Lg. ≙ 40,3 Vol.% CO_2 = rot 55 µl Stand.-Lg. ≙ 49,3 Vol.% CO_2 = farblos
5	Es ist zu vermeiden, daß Atemluft des Untersuchers (CO_2!) in die M-RG bzw. PA-Deckel gelangt. Die Probeansätze sind sofort (!) zu verschließen.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1977
Proben mit einer AR-Differenz von 5 Vol.% CO_2 sind deutlich voneinander zu unterscheiden.	
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 400 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

KREATININ	N 01.1

Pikrinsäure-Methode:
Kreatinin bildet mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung eine orangerote Komplexverbindung.

Serum, Plasma, Harn (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Pikrinsäure-Lg.		2,0 g umkristallisierte Pikrinsäure durch Erhitzen in 100 ml dest. Wasser lösen. Nach 24 Stunden Lg. vom Bodenkörper abdekantieren. (Umkristallisieren von Pikrinsäure: 1 Teil Pikrinsäure durch Erhitzen in 1,5 Vol.-Teilen Eisessig lösen; eine Spatelspitze Aktivkohle zugeben; 3 Min. unter Rühren weiter erhitzen. Heiß filtrieren. Nach dem Abkühlen Pikrinsäure-Kristalle absaugen und feucht in brauner Glasflasche aufbewahren).
2	Salzsäure	ca. 0,1 N	8,3 ml Salzsäure p.a. (37 %) mit dest. Wasser zu 100 ml auffüllen.
3	Natronlauge	ca. 0,25 N	10 g Natriumhydroxid p.a. in dest. Wasser lösen; zu 100 ml auffüllen.
4	Kreatinin-Standard-Lg. a	100 mg/ 100 ml	50 mg Kreatinin p.a. (über Phosphorpentoxid getrocknet) in 0,1 N Salzsäure zu 50 ml Lg. lösen.
5	Kreatinin-Standard-Lg. b	2 mg/ 100 ml	1 ml der Kreatinin-Stand.-Lg. a mit 0,1 N Salzsäure zu 50 ml auffüllen.

KREATININ	Pikrinsäure-Methode	Serum, Plasma	N 01.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PH	1,0 ml Pikrinsäure-Lg.	
2		P: + 0,3 ml Serum (Plasma) L: + 0,3 ml Wasser St: + 0,3 ml Kr.-Stand.-Lg. b schütteln (30 Sek.). 15 Sek. im kochenden Wasserbad erh.; in kaltem Wasser abkühlen; zentrifugieren.	
3	H-RG	0,8 ml Überstand + 0,7 ml Natronlauge mischen; dunkel stellen.	
4		Nach 20 Min. P und St gegen L bei 530 nm photometrieren.	

Berechnung:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot 2 = x \text{ mg Kreatinin/100 ml Serum (Plasma)}$$

KREATININ	Pikrinsäure-Methode	Harn	N 01.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
1	PH (H-RG)	1,00 ml Pikrinsäure-Lg.			
2		P	L	St	2
		+ 0,01 ml Harn	+ 0,01 ml Wasser	+ 0,01 ml Kr.-Stand.-Lg. a	
		mischen.			
3		+ 0,80 ml Natronlauge			
		mischen; dunkel stellen.			
4		Nach 20 Min. P und St gegen L bei 530 nm photometrieren.			

Berechnung:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot 1\,000 = x \text{ mg Kreatinin/1 000 ml Harn}$$

KREATININ	Pikrinsäure-Methode	Serum, Plasma Harn	N 01.1

Anmerkungen:

1	Für die Bestimmung ist zentrifugierter Harn (max. Lagerzeit: Zimmertemp.: 2 Tage; 2 - 5 °C: 4 Wochen) zu verwenden. Eingefrorene und wiederaufgetaute Harnproben sind nicht einzusetzen.
2	Ende der Pipettenspitze in die Pikrinsäure-Lg. eintauchen und durch Aufziehen und Ausstoßen der Reaktions-Lg. ausspülen.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1974, 1978
Wiederauffindung:	97 - 101 %
Präzision:	
in der Serie: (n = 20)	s % ≤ 2,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % ≤ 3,0
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 150 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

HARNSTOFF	N 02.1

Modifizierte Diazetylmonoxim-Methode:

Diazetyldioxim wird teilweise hydrolysiert. Das entstehende Diazetylmonoxim bildet mit Harnstoff eine gelbe Komplexverbindung.

Serum, Plasma (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Diazetyldioxim-Lg.		1 g Diazetyldioxim (= Dimethylglyoxin) in 91 ml abs. Äthanol lösen; 23 ml dest. Wasser zugeben.
2	Schwefelsäure-Lg.		Zu 0,5 g Phenazon u. 0,45 g Eisen(II)-ammoniumsulfat 60 ml dest. Wasser u. 15 ml. konz. Schwefelsäure p.a. (Vorsicht!) geben. Nach vollständigem Auflösen mit dest. Wasser zu 100 ml auffüllen.
3	Perchlorsäure-Lg.	ca. 0,5 N	48 ml 70 %ige Perchlorsäure in ca. 900 ml dest. Wasser einfließen lassen; zu 1 000 ml auffüllen.
4	Harnstoff-Standard-Lg.	40 mg/ 100 ml	40 mg Harnstoff (über Phosphorpentoxid getrocknet) in dest. Wasser zu 100 ml Lg. lösen.

HARNSTOFF	Modif. Diazetylmonoxim-Methode	Serum Plasma	N 02.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PA	1,00 ml Perchlorsäure-Lg.	
2		P: + 0,02 ml Serum (Plasma) — L: + 0,02 ml Wasser — St: + 0,02 ml Harnst.-St.-Lg. schütteln (1 Min.); zentrifugieren.	
3	PH *	0,30 ml Überstand + 0,20 ml Diazetyldioxim-Lg. + 1,00 ml Schwefelsäure-Lg. mischen; 30 Min. im kochenden Wasserbad erhitzen. Abkühlen lassen. 20 Sek. zentrifugieren (T 30).	2 3
4		P und St gegen L bei 470 nm photometrieren.	

Berechnung:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot 40 = x \text{ mg Harnstoff/100 ml Serum (Plasma)}$$

Anmerkungen:

1	Die Proben sind möglichst umgehend aufzuarbeiten. Eingefrorene und wiederaufgetaute Proben ergeben im allgemeinen zu niedrige Harnstoffkonzentrationen. Enteiweißte Proben können bis zur Bestimmung mehrere Tage bei 2 - 5 °C aufbewahrt werden.
2	Für den Arbeitsschritt 3 werden Plastehülsen 10 ml (PH*) verwendet. Beim Erhitzen der Reaktionsmischung sind die Plastehülsen mit einem Plastedeckel, der in der Mitte mit einer Nadel durchstochen wird, zu verschließen.
3	Durch das Zentrifugieren werden die Kondensattropfen im Oberteil der PH* in die Reaktionsmischung zurückbefördert.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1978
Wiederauffindung:	95 - 100 %
Präzision: in der Serie: (n = 20)	s % $\leq$ 4,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % $\leq$ 5,0
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 150 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

VITAMIN A	V 01.1

CARR-PRICE-Methode:
Antimontrichlorid bildet mit Vit. A in Chloroform eine intensiv blaue Anlagerungsverbindung.

Leber, Kolostrum

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Chloroform DAB 7		2 x mit dest. Wasser waschen, mit Na_2SO_4 trocknen, fraktioniert destillieren (Kp. 61,2 °C).
2	Natriumsulfat DAB 7 (wasserfrei)		
3	Essigsäureanhydrid reinst		
4	Antimon(III)-chlorid-Lg.		25 g $SbCl_3$ (zur Vitamin A-Bestimmung) in 100 ml Chloroform im Erlenmeyerkolben unter Erwärmung (Wasserbad) lösen, mit Na_2SO_4 trocknen, lichtgeschützt bei 2 - 5 °C lagern. Vor Gebrauch vom evtl. Bodenkörper abdekantieren u. zu 50 ml Lg. 1 ml Essigsäureanhydrid geben. Achtung! Lg. ist extrem wasserempfindlich. Verschlossen aufbewahren!
5	Äthanol	96 %	
6	Kalilauge	30 %	30 g Kaliumhydroxid p.a. in 70 ml dest. Wasser lösen.
7	Trichloressigsäure-Lg.	10 %	10 g Trichloressigsäure in 90 ml dest. Wasser lösen.
8	Kupfersulfat-Lg.		8 g Kupfersulfat in 100 ml dest. Wasser lösen. 1 ml konz. Salzsäure zugeben.
9	Cyclohexan rein		

Fortsetzung Blatt 2

Reagenzien (Fortsetzung):

Nr.	Reagenz	Konzentration	Herstellung
10	Vit.A-Standard-Lg. a	300 IE/ml	1 Kapsel Vit.A-Alkohol Jenapharm (30 000 IE) wird unter Cyclohexan aufgeschnitten und mit Cyclohexan zu 100 ml Lg. aufgefüllt.
11	Vit.A-Standard-Lg. b	60 IE/ml	10 ml Vit.A-Lg. a mit Cyclohexan auf 50 ml auffüllen. Haltbarkeit: 1 Woche.
12	Vit.A-Standard-Lg. c	6 IE/ml	1 ml Vit.A-Lg. a mit Cyclohexan auf 50 ml auffüllen. Haltbarkeit: 1 Woche.
	Die Vit.A-Standard-Lösungen sind in dunkler Flasche bei 2 - 5 °C aufzubewahren.		

In den Arbeitsvorschriften werden folgende zusätzliche Abkürzungen verwendet:

C-h.: Cyclohexan; KOH: Kalilauge
Äth.: Äthanol

VITAMIN A	CARR-PRICE-Methode	Leber	V 01.1

Ausführung:

A. Verseifung der Leber:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PH	1,0 g Leberhomogenat + 1,0 ml Kalilauge PH mit Innendeckeln verschließen. 30 Min. bei 60 °C erhitzen (Al.-Block); auf Raumtemp. abkühlen (Wasserbad). Lg. weiter nach B. verarbeiten.	1

B. Extraktion und Bestimmung des Vitamin A:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	PH	Lg. aus A. + 1,0 ml Äth. + 1,5 ml C-h. -	1,0 ml KOH + 1,0 ml Äth. + 1,5 ml C-h. -	1,0 ml KOH + 1,0 ml Äth. - + 1,5 ml Vit.-A-Stand.-Lg. b	
		PH mit Innendeckeln verschließen. 2 Min. schütteln (Schüttelmaschine!), 20 Sek. zentrifugieren.			
2	H-RG	0,05 ml obere Phase + 0,45 ml C-h. + 1,00 ml Antimon(III)-chlorid-Lg. mischen.			2 3
3	Meßansatz ER 1	Nach genau 10 Sek. P und St gegen L bei 620 nm im H-RG photometrieren.			4

VITAMIN A	CARR-PRICE-Methode	Kolostrum	V 01.1

Ausführung:

A. Aufarbeitung und Verseifung des Kolostrums:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PH	1,0 ml Kolostrum + 2,0 ml Trichloressigsäure-Lg. PH mit Innendeckeln verschließen; schütteln; 30 Sek. zentrifugieren; Überstand verwerfen.	
2		Rückstand + 0,9 ml KOH PH mit Innendeckeln verschließen. 45 Min. bei 60 °C (Al-Block!) erhitzen; auf Raumtemp. abkühlen (Wasserbad); Lg. weiter nach B. verarbeiten.	

B. Extraktion und Bestimmung des Vitamin A:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	PH	Lg. aus A. + 0,9 ml Äth. + 1,8 ml C-h. -	0,9 ml KOH +0,9 ml Äth. +1,8 ml C-h. -	0,9 ml KOH +0,9 ml Äth. - +1,8 ml Vit.A-Stand.-Lg. c	
		PH mit Innendeckeln verschließen; 2 Min. schütteln (Schüttelmaschine); 10 Sek. zentrifugieren.			
2	H-RG	0,5 ml obere Phase + 1,0 ml Antimon(III)-chlorid-Lg. mischen.			2, 3
3	Meßansatz ER 1	Nach genau 10 Sek. P und St gegen L bei 620 nm im H-RG photometrieren.			

Berechnung:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot F = x \text{ IE Vit.A/g (ml)}$$

Leber: F = 90
Kolostrum: F = 10,8

1 IE Vitamin A ≙ 0,3 µg Vit.A-Alkohol

Anmerkungen:

1	Gefrorene Leber in kleine Stücke zerschneiden und im Homogenisator oder Schlagbecher (geschärfte Messer) homogenisieren. Bei Ferkeln ist die gesamte Leber zu homogenisieren.
2	H-RG (100 mm lang!) vor Gebrauch mit Kupfersulfat-Lg. optisch prüfen (Extinktionsmessung!). H-RG als Einwegmaterial benutzen!
3	Bei Vitamin A-Konzentrationen über 200 IE/g Leber bzw. Extinktionen >0,5 ist der Überstand mit Cyclohexan zu verdünnen! Die Verdünnung ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

VITAMIN A	CARR-PRICE-Methode	Leber Kolostrum	V 01.1

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:		IaT Eberswalde-Finow; 1975
Wiederauffindung:	Leber: Milch:	% %
Präzision:		
in der Serie: (n = 20)	Leber Milch	s % ≤ 4,0 s % ≤ 4,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	Leber Milch	s % ≤ 7,0 s % ≤ 9,0
Probenzahl/Tag · AK:		40 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

VITAMIN A	V 01.2

Fluorimetrische Bestimmung:
Vitamin A wird nach Verseifung seiner Ester mit Cyclohexan extrahiert. Die Konzentration des Vitamin A wird aus der Differenz der Fluoreszenzintensität des Extrakts vor und nach UV-Bestrahlung berechnet.

Plasma, Leber, Milch

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Cyclohexan		Fraktioniert destillieren (Kp. 80,8 °C); in dunkler Flasche bei 2 - 5 °C aufbewahren (Fluoreszenzintensität $\leq$ 3 Einheiten!).
2	Äthanol (unvergällt)	96 %	Fraktioniert destillieren (Kp. 78,3 °C); bei 2 - 5 °C aufbewahren (Fluoreszenzintensität $\leq$ 3 Einheiten!).
3	Kalilauge	30 %	30 g Kaliumhydroxid p.a. in 70 ml dest. Wasser lösen.
4	Trichloressigsäure-Lg.	10 %	10 g Trichloressigsäure p.a. in 90 ml dest. Wasser lösen.
5	Vitamin A-Standard-Lg. a	300 IE/ml	1 Kapsel Vitamin A-Alkohol Jenapharm (30 000 IE) unter Cyclohexan zerschneiden und zu 100 ml Lg. mit Cyclohexan auffüllen.
6	Vitamin A-Standard-Lg. b	6 IE/ml	1 ml Vitamin A-Stand.-Lg. a mit Cyclohexan zu 50 ml Lg. verdünnen.
7	Vitamin A-Standard-Lg. c	1,2 IE/ml	2 ml Vitamin A-Stand.-Lg. b mit Cyclohexan zu 10 ml Lg. auffüllen. Lg. täglich frisch bereiten.

Fortsetzung Blatt 2

Reagenzien (Fortsetzung):

8	Vitamin A-Standard.-Lg. d	60 IE/ml	10 ml Vitamin A-Stand.-Lg. a mit Cyclohexan zu 50 ml Lg. verdünnen.
	Die Vitamin A-Standard-Lösungen sind in dunkler Flasche bei 2 - 5 °C aufzubewahren.		

In dieser Arbeitsvorschrift werden folgende zusätzliche Abkürzungen verwendet:

C-h.:	Cyclohexan	KOH:	Kalilauge
Äth.:	Äthanol	H_2O:	Wasser

VITAMIN A	Fluorimetrische Bestimmung	Plasma	V 01.2

<u>Ausführung:</u>

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PH	1,0 ml Äthanol in Wasserbad (ca. 15 °C) stellen.	1
2		P: + 1,0 ml Plasma; + 2,0 ml C-h; – L: + 1,0 ml H_2O; + 2,0 ml C-h; – St: + 1,0 ml H_2O; –; + 2,0 ml Vit. A-Stand.-Lg. c PH mit Innendeckeln verschließen; 2 Min. schütteln (Schüttelmaschine), 20 Sek. zentrifugieren. Extrakt umgehend weiterverarbeiten!	
3		Ca. 1,7 ml Extrakt (obere Phase) in Küvette überführen. Fluoreszenzintensität gegen Glasstandard messen.	1, 2
4	PH	Extrakt nach der Messung in neue PH zurückgießen. Von oben 15 Min. mit UV-Licht bestrahlen.	1, 3
5		Fluoreszenzintensität des UV-bestrahlten Extrakts messen (s. Arbeitsschritt 3).	1, 2

<u>Berechnung:</u> s. Blatt 8



Ausführung:

A. Verseifung der Leber

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PH	1,0 g Leberhomogenat + 1,0 ml Kalilauge PH verschließen. 30 Min. bei 60 °C erhitzen (Aluminium-Block). Im Wasserbad auf ca. 15 °C abkühlen. Lg. weiter nach B. verarbeiten	4

B. Extraktion und Bestimmung des Vitamin A

	Geräte	Ausführung P	Ausführung L	Ausführung St	Anmerkungen
1	PH	Lg. aus A. + 1,0 ml Äth. + 1,5 ml C-h. -	1,0 ml KOH + 1,0 ml Äth. + 1,5 ml C-h. -	1,0 ml KOH + 1,0 ml Äth. - + 1,5 ml Vit. A-Stand.-Lg. d	1
		PH mit Innendeckeln verschließen; 2 Min. schütteln (Schüttelmaschine). 20 Sek. zentrifugieren. Extrakt umgehend weiterverarbeiten!			
2	PH	2,00 ml C-h. + 0,04 ml obere Phase			1, 2
		mischen; in Küvette überführen; Fluoreszenzintensität gegen Glasstandard messen.			5
3		Lg. in PH zurückgießen; von oben 15 Min. mit UV-Licht bestrahlen.			1, 3
4		Fluoreszenzintensität der UV-bestrahlten Lg. messen (s. Arbeitsschritt 2).			1, 2

Berechnung: s. Blatt 8

Ausführung:

A. Aufarbeitung und Verseifung der Milch

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
	PH	1,00 ml Milch + 2,00 ml Trichloressigsäure-Lg. bzw.: (0,25 ml Kolostrum + 0,50 ml Trichloressigsäure-Lg.) PH mit Innendeckeln verschließen. Schütteln; zentrifugieren (60 Sek.!). Überstand verwerfen.	
		+ 0,90 ml Kalilauge PH verschließen. 45 Min. bei 60 °C erhitzen (Aluminium-Block). Im Wasserbad auf ca. 15 °C abkühlen. Lg. weiter nach B. verarbeiten.	

Fortsetzung Blatt 6

Ausführung (Fortsetzung von Blatt 5):

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	PH	Lg. aus A. + 0,9 ml Äth. + 2,0 ml C-h. -	0,9 ml KOH + 0,9 ml Äth. + 2,0 ml C-h. -	0,9 ml KOH + 0,9 ml Äth. - + 2,0 ml Vit. A-Stand.-Lg.	1
		PH mit Innendeckeln verschließen. 2 Min. schütteln (Schüttelmaschine). 20 Sek. zentrifugieren. Extrakt umgehend weiterverarbeiten.			
2		Ca. 1,7 ml Extrakt (obere Phase) in Küvette überführen. Fluoreszenzintensität gegen Glasstandard messen.			1, 2, 5
3	PH	Extrakt nach der Messung in neue PH zurückgießen. Von oben 15 Min. mit UV-Licht bestrahlen.			1, 3
4		Fluoreszenzintensität des UV-bestrahlten Extrakts messen (siehe Arbeitsschritt 2).			1, 2

Berechnung: s. Blatt 8

Anmerkungen:

1	Während der Pipettierungen und der UV-Bestrahlung sind die PH in einem Wasserbad bei einer Temperatur von ca. 15 °C zu halten.
2	Meßanordnung: Geräte: SPEKOL mit Meßansatz FK1 Zusatzeinrichtung QL (Quecksilberlampe) Primärwellenlänge: 366 nm Filter UG2 zw. FK1 u. Lichtaustrittsspalt am SPEKOL Sekundärfilter: 500 - 3 000 nm (OG4) Zusatzverstärker ZV (Verstärkerstufe 1 000) Empfängereinrichtung m. Photovervielfacher Pho M (Verstärkerstufe 3) Eichung: Einstellung der Fluoreszenzintensität des farblosen Glasstandards (WG9) auf den Wert 55. Dabei ist der Zusatzverstärker ZV auf die Verstärkerstufe 50 zurückzuschalten.
3	Zur UV-Bestrahlung der Proben eignet sich eine SOLIMED-Tisch-Quarzlampe (ohne untere Filterplatte). Der Abstand zwischen Lampengehäuse und Proben soll ca. 20 cm betragen.
4	Gefrorene Leber in kleine Stücke zerschneiden und im Homogenisator oder Schlagbecher (geschärfte Messer) homogenisieren. Bei Ferkeln ist die gesamte Leber zu homogenisieren.
5	Bei Vitamin A-Konzentrationen in der Leber >90 IE/g, im Kolostrum > 9 IE/ml bzw. in der Milch > 2 IE/ml sind die Extrakte mit Cyclohexan zu verdünnen. Bei der Konzentrationsberechnung ist der Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen (Blatt 8).

Berechnung:

$$\frac{(F_{P_0} - F_{P_{15}}) + (F_{L_{15}} - F_{L_0})}{(F_{St_0} - F_{St_{15}}) + (F_{L_{15}} - F_{L_0})} \cdot F = x \text{ IE Vit.A/ml (g)}$$

Plasma: F = 2,4
Leber: F = 91,8
Milch: F = 2,4
Kolostrum: F = 9,6

1 IE Vit. A $\hat{=}$ 0,3 μg Vit. A-Alkohol

Achtung! Evtl. Verdünnung der Leber- bzw. Milchextrakte beachten! (Anmerkung 5)

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow; 1975	
Wiederauffindung:	97 - 102 %	
Präzision:		
in der Serie: (n = 20)	Plasma:	s % ≤ 3,0
	Leber:	s % ≤ 3,0
	Milch:	s % ≤ 2,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	Plasma:	s % ≤ 5,0
	Leber:	s % ≤ 6,0
	Milch:	s % ≤ 6,0
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 40 (Einfachbestimmungen)	

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

